

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

18.6.2004

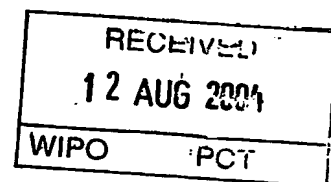
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 4月16日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-111994
[ST. 10/C]: [JP 2003-111994]

出 願 人
Applicant(s): 積水化学工業株式会社

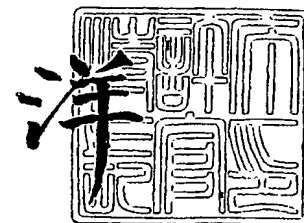


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月29日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 03P00464

【提出日】 平成15年 4月16日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C01G 49/00

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社
 内

 【氏名】 岡 孝之

【特許出願人】

 【識別番号】 000002174

 【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

 【代表者】 大久保 尚武

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005083

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書**【発明の名称】 磁性体内包粒子および免疫測定法****【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 スチレン系モノマーとグリシジル基含有モノマーからなる共重合体を主構成成分とする有機高分子物質と磁性体からなる磁性体内包粒子であって、該粒子がその内部に平均粒径 1 ～ 30 nm の磁性体を分散状態で 0.1 ～ 50 重量%含有することを特徴とする磁性体内包粒子。

【請求項 2】 該有機高分子物質中のスチレン系モノマーの比率が 5 ～ 90 重量%であることを特徴とする請求項 1 に記載の磁性体内包粒子。

【請求項 3】 該有機高分子物質が架橋されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の磁性体内包粒子。

【請求項 4】 平均粒子径が 0.05 ～ 0.5 μ m であることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 のいずれかに記載の磁性体内包粒子。

【請求項 5】 該磁性体内包粒子の表面層に、カルボキシル基、水酸基、エポキシ基、アミノ基、トリエチルアンモニウム基、ジメチルアミノ基及びスルホン酸基よりなる群より選ばれる、抗原または抗体との共有結合可能な官能基を有することを特徴とする請求項 1、2、3 又は 4 のいずれかに記載の磁性体内包粒子。

【請求項 6】 スチレン系モノマーとグリシジル基を含有するモノマーからなる共重合体を主構成成分とする有機高分子物質と磁性体からなる磁性体内包粒子であって、該粒子がその内部に平均粒径 1 ～ 30 nm の磁性体を分散状態で含有することを特徴とする磁性体内包粒子に抗原または抗体が吸着または結合された免疫測定用粒子。

【請求項 7】 請求項 1、2、3、4 又は 5 のいずれかに記載の磁性体内包粒子または請求項 6 に記載の免疫測定用粒子を用いる免疫測定法。

【請求項 8】 請求項 1、2、3、4 又は 5 のいずれかに記載の磁性体内包粒子を標識として用いることを特徴とする免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、磁性体微粒子を内包する高分子粒子およびそれを用いる免疫測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、磁性体含有高分子粒子の作製法として（１）作製済みの高分子粒子に鉄イオンを含ませて磁性体を作製する方法、（２）モノマーから粒子を重合する過程で作製済みの磁性体粒子を含ませる方法（特許文献１参照）、（３）別々に作製した高分子粒子と磁性体粒子とを複合化させる方法（特許文献２参照）が知られている。また、この他、（４）磁性体粒子を高分子等で被覆する方法（特許文献３参照）がある。

【0003】

（１）の方法は鉄イオンを粒子に吸収させるため、表面に磁性体が露出し、磁性体が酸化するという課題があった。また（２）の方法は磁性体粒子が均一に粒子に取り込まれないという課題や粒径の制御が困難で、粒径分布の広い物となるという課題があった。また、（３）の方法は高分子粒子が凝集するため、粒径の小さな粒子には使用できないという課題がある。また、（４）の方法は、被覆が均一にできないため、浮遊性や分散性が悪く、また、磁性体粒子表面の一部が露出している場合があった。

【0004】

一方、従来から知られている微量免疫測定法としては、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等が既に実用化されている。これらの方法は、それぞれアイソトープ、酵素、蛍光物質を標識として付加した抗原又は抗体を用い、これと特異的に反応する抗体又は抗原の有無を検出する方法である。このような免疫測定法に際して、磁性体内包粒子は、効率よくかつ簡便にＢ／Ｆ分離を行うために用いられている。また、Ｂ／Ｆ分離以外の使用（特許文献４参照）や、磁性体内包粒子自体を標識材料とする免疫測定法（特許文献５、特許文献６、特許文献７参照）が開示されている。

【0005】

【特許文献１】

特開平9-208788号公報

【特許文献2】

特開平6-231957号公報

【特許文献3】

特開平6-92640号公報

【特許文献4】

特開2000-88852号公報

【特許文献5】

特開平6-148189号公報

【特許文献6】

特開平7-225233号公報

【特許文献7】

特表2001-524675号公報

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記課題に鑑み、均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子およびそれを用いる免疫測定法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明の磁性体内包粒子は、スチレン系モノマーとグリシジル基含有モノマーからなる共重合体を主構成成分とする有機高分子物質と磁性体からなる磁性体内包粒子であって、該粒子がその内部に平均粒径1～30nmの磁性体を分散状態で0.1～50重量%含有することを特徴とする。

請求項2の発明では、上記有機高分子物質中のスチレン系モノマー比率が5～90重量%であることを特徴とする磁性体内包粒子である。

請求項3の発明では、上記の有機高分子物質が架橋されていることを特徴とする磁性体内包粒子である。

請求項4の発明では、平均粒子径が0.05～0.5μmであることを特徴とす

る磁性体内包粒子である。

請求項 5 の発明では、上記磁性体内包粒子の表面層にカルボキシル基、水酸基、エポキシ基、アミノ基、トリエチルアンモニウム基、ジメチルアミノ基及びスルホン酸基よりなる群より選ばれる、抗原または抗体との共有結合可能な官能基を有することを特徴とする。

請求項 6 の発明では、スチレン系モノマーとグリシジル基含有モノマーを主構成成分とするモノマー混合物を重合してなる有機高分子物質と磁性体からなる磁性体内包粒子であって、該粒子がその内部に平均粒径 1 ～ 30 nm の磁性体を分散状態で含有することを特徴とする磁性体内包粒子に抗原または抗体が吸着または結合された免疫測定用粒子である。

請求項 7 の発明では、上述の磁性体内包粒子または上記の免疫測定用粒子を用いる免疫測定法である。

請求項 8 の発明では、上述の磁性体内包粒子を標識として用いることを特徴とする免疫測定法である。

【0008】

本発明の磁性体内包粒子は、磁性体が粒子表面に露出することなく、粒子内部に分散した状態で存在している。より詳しくは、磁性体の前駆体である金属イオンおよび金属イオンとの親和性を持ちつつ粒子のコアを形成するためのスチレン系モノマーとグリシジル基含有モノマーからなる疎水性モノマー混合物と、水中で安定に分散する高分子粒子を形成しつつ粒子のシェルを構成するための親水性モノマーからなり、その重合による粒子生成と磁性体生成を同時進行させることにより、磁性体を粒子内に内包した磁性体内包粒子を調整している。その磁性体は、製造条件により、平均粒径 1 ～ 30 nm の均一な大きさと、粒子内部に均一に分散した状態で内包させることができる。

【0009】

本発明の磁性体内包粒子を構成する有機高分子物質は、スチレン系モノマーとグリシジル基含有モノマーを主構成成分とするモノマー混合物を重合して得られる。スチレン系モノマーとしては、スチレン、 α -メチルスチレン、p-メチルスチレン、p-クロロスチレン、クロロメチルスチレン等が挙げられる。これら単

量体は単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

【0010】

上記有機高分子物質中のスチレン系モノマー比率が5～90重量%である。スチレン系モノマー比率が5重量%未満の場合は、水中での分散安定性が低くなり、重合中に自己凝集し易くなる。また、スチレン系モノマー比率が90重量%を超えると、磁性体の前駆体である金属イオンとの親和性が低くなり、粒子内に形成する磁性体が少なくなる。

【0011】

グリシジル基を含有するモノマーとしては、グリシジルメタクリレート、グリシジルアクリレートなどグリシジル基を含有するビニル化合物が挙げられる。

【0012】

グリシジル基含有モノマーは、重合による粒子作製とマグネタイト等の磁性体の生成を同時進行させる際に、粒子重合中に高濃度に磁性体イオンを取り込む能力に優れている。上記モノマーの中でも、特にグリシジルメタクリレートは鉄イオンおよびマグネタイトとの親和性が高いため好適に使用される。

【0013】

また、上記モノマーに他の疎水性モノマーを共重合することができる。上記疎水性モノマーとしては、例えば塩化ビニル；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル類；アクリロニトリル等の不飽和ニトリル類；（メタ）アクリル酸メチル、（メタ）アクリル酸エチル、（メタ）アクリル酸ブチル、（メタ）アクリル酸2-エチルヘキシル、（メタ）アクリル酸ステアシル、エチレングリコール（メタ）アクリレート、トリフルオロエチル（メタ）アクリレート、ペンタフルオロプロピル（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、グリシジルメタクリレート、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレート等の（メタ）アクリル酸エステル誘導体等が挙げられる。これら単量体は単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

【0014】

また、本発明の特定の局面では架橋性モノマーが使用される。架橋性モノマーとしては、ジビニルベンゼン、ジビニルビフェニル、ジビニルナフタレン、エチ

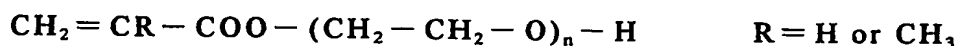
レングリコールジ（メタ）アクリレート、1,6-ヘキサンジオールジ（メタ）アクリレート、ネオペンチルグリコールジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールメタントリトリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールプロパンテトラ（メタ）アクリレート、ジアリルフタレート及びその異性体、トリアリルイソシアヌレート及びその誘導体等が挙げられる。これら架橋性単量体は単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。この中でも、エチレングリコールジメタアクリレートは鉄イオンおよびマグネタイトとの親和性が高いため好適に使用される。

【0015】

親水性モノマーとしては、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、フマル酸、マレイン酸等の重合性不飽和結合を有するカルボン酸、重合性不飽和結合を有するリン酸エステルや重合性不飽和結合を有するスルホン酸エステル等、ジメチルアミノエチルメタクリレート4級塩、ジエチルアミノエチルメタクリレート4級塩等のアクリロイル基を有するアミンの塩やビニルピリジン等のビニル基を有する含窒素化合物の塩等カチオン基を有するビニル系単量体、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、（メタ）アクリルアミド、メチロールアクリルアミド、グリセロールメタクリレート等の非イオン性ビニル系単量体が挙げられる。これら親水性モノマーは、単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

【0016】

この中でも、親水性モノマーが下記一般式



で表されるポリエチレングリコール（メタ）アクリレートは、水中で粒子を安定に分散する能力が高く、磁性体の生成を妨げないので好適に使用される。上記一般式の n は 1～20、好ましくは、2～10である。

【0017】

本発明の金属イオンは磁性体を形成するものであれば特に限定されないが、好ましくは、鉄イオン、コバルトイオン、ニッケルイオンである。より好ましくは

、鉄イオンである。

【0018】

磁性体であるマグネタイトは塩化第2鉄を酸化剤等で酸化して得られる。重合開始剤により、上述のモノマーの重合を開始するとともに2価の鉄イオンの酸化（マグネタイト化）を行うことにより磁性体（マグネタイト）内包粒子を作製する。

【0019】

重合開始剤としては特に限定されず、例えば水溶性の有機アゾ化合物、無機過酸化物、有機過酸化物等が挙げられる。

重合開始剤の好適な例としては、過硫酸カリウム（KPS；重合温度70℃），アゾビスアミジノプロパン塩酸塩（V-50；重合温度70℃），（VA-044；重合温度60℃）が挙げられる。このうち過酸化物系重合開始剤であるKPSは、重合開始とともに2価の鉄イオンの酸化に寄与することを期待して、モノマーと鉄イオンによる、重合とマグネタイト生成との同時進行を想定している。V-50およびVA-044は酸化力が弱く、2価の鉄イオンの緩やかな酸化反応に関与する開始剤となる。

【0020】

重合開始剤は、 Fe^{2+} の酸化による消費や Fe^{3+} によってラジカル活性を失う場合があるため、粒子成長を促す目的で、粒子成長過程に後添加することが有効である。この場合、新たな2次粒子は形成されず、粒子表面がポリマーで被覆される。

【0021】

本発明において、重合と同時にマグネタイトを作製するにあたっては、重合系内のpHを塩基性に調整することが重要となる。重合開始剤にKPSを用いた系では、メリットとして水中での分散安定性がよく、粒径分布の狭い単分散粒子が得られるが、デメリットとして酸化力の制御ができず、重合系内が酸性になるために磁石への引き寄せられ方の弱い粒子になることである。一方、酸化力を持たないVA-044を用いた系でのメリットは、重合系内のpHがほぼ中性であることである。

【0022】

重合系内のpHを弱塩基性に保つには、一般的な塩基を使用することができる。

好適には NH_4OH がpH調整剤として使用される。上記pH調整剤は、必要に応じて数回添加することができる。

【0023】

また、本発明の特定の局面では、磁性体内包粒子の表面層にカルボキシル基、水酸基、エポキシ基、アミノ基、トリエチルアンモニウム基、ジメチルアミノ基及びスルホン酸基よりなる群より選ばれる、抗原または抗体との共有結合可能な官能基を有する。

【0024】

上記官能基は、各々の官能基を有するモノマーを予め配合する、あるいは、重合途中に添加することで磁性体内包粒子の表面層に導入できる。官能基を有するモノマーとしては、例えば、カルボキシル基：（メタ）アクリル酸、水酸基：（メタ）アクリル酸-2-ヒドロキシエチル、エポキシ基：グリシジル（メタ）アクリレート、トリエチルアンモニウム基：トリエチルアンモニウム（メタ）アクリレート、ジメチルアミノ基：ジメチルアミノ（メタ）アクリレートなどが挙げられる。

【0025】

（重合方法）

本発明の磁性体内包粒子の製造としては、懸濁重合、分散重合、乳化重合、ソープフリー乳化重合等の粒子重合法が使用できるが、Cv値として5%以下であることが望ましいことから、ソープフリー乳化重合により好適に製造される。

【0026】

以下、ソープフリー乳化重合による磁性体内包粒子の作製方法を例示するが、この方法に限定されるわけではない。

代表的な重合組成は、

疎水性モノマー／親水性モノマーからなるモノマー組成物：3 g

H_2O ：100 g

からなる。四つ口フラスコに上記モノマーおよび水を秤量する。それぞれの口には攪拌棒、還流冷却管を取り付ける。開始剤にKPSを用いた系では70℃の恒温槽に入れ、攪拌しながら系内を窒素置換する。その後、水に溶かした開始剤を注射

筒で系内に注入する。この時を重合開始とし、所定時間後に注射筒を用いて磁性源となる $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ の水溶液を注入する。 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ は開始剤の $1/3 \sim 4$ 倍モルを水5gに溶かしたものを使用する。重合は開始から2時間～24時間行うことが好ましい。適度な酸化力を得るために、重合途中に NH_4OH を加える。さらに、粒子の成長を促すために、重合途中に開始剤を加える。この様にして磁性体を内包した樹脂粒子を得る。

【0027】

作製した粒子は、残存モノマー・開始剤、未反応の鉄イオンを取り除くために遠心分離・再分散を蒸留水で繰り返し行うことで精製する。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行う。精製後、ガラス製バイアルに移し、ふた・パラフィルムで密閉・保存する。

【0028】

本発明の磁性体内包粒子の平均粒径は、 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の範囲とされるのが好ましく、平均粒径は、重合条件により調整することができる。また、磁性体含有量は、 $0.1 \sim 50$ 重量%の範囲とされる。より好ましくは $0.1 \sim 40$ 重量%の範囲であり、含有量は重合組成により調整することができる。

【0029】

本発明の免疫測定用粒子は、上述のように得られた磁性体内包粒子に抗原または抗体を吸着または結合させることにより得ることができる。抗体または抗原を磁性体内包粒子に吸着または結合させる方法としては、物理吸着法やカルボジイミドを用いた化学結合法など公知の方法が使用することができる。

【0030】

また、本発明の免疫測定法としては、磁性体内包粒子を坦体として用いたラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイなど公知の方法が挙げられ、サンドイッチ法や競合法により、目的とする抗原あるいは抗体を測定することができる。また、上記方法の標識物質であるアイソトープ、酵素などの代わりに、磁性体内包粒子の磁性体を標識として用いた免疫測定法を提供することができる。本発明の磁性体内包粒子によれば、磁性体を均一に分散含有する粒子径分布の狭い粒子で

あるため、磁性体を標識とする免疫測定法において感度よく精密に測定することができる。

【0031】

【実施例】

以下実施例を示すが、本発明はこの例に限定されるものではない。

(実施例1)

200mlの四つ口フラスコにスチレン3.0g、グリシジルメタクリレート3.0g、ポリエチレングリコールメタクリレート0.3g、エチレングリコールジメタクリレート0.03gおよび水200gを秤量した。それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付けた。系を70℃の恒温槽に入れ、200rpmで攪拌しながら系内を30分間窒素置換した。その後、水に溶かした開始剤であるKPS 0.1gを20gの水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時を重合開始とし、2分後に注射筒を用いて $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 (0.2g/20ml) を注入した。重合は重合開始から20時間行った。適度な酸化力を得るために、重合途中に NH_4OH 0.4gを加えた。

【0032】

作製した粒子は、精製のために遠心分離・再分散を蒸留水で4回繰り返す行うことで精製した。この際、遠心分離は20℃、13500rpmで行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体内包粒子を得た。

【0033】

(実施例2)

スチレン2.0g、グリシジルメタクリレート4.0gに変更したこと以外は実施例1と同様に磁性体内包粒子を作製した。

【0034】

(実施例3)

スチレン4.0g、グリシジルメタクリレート1.0gに変更したこと以外は実施例1と同様に磁性体内包粒子を作製した。

【0035】

(比較例 1)

200mlの四つ口フラスコにグリシジルメタクリレート6.0g、ポリエチレングリコールメタクリレート0.3g、エチレングリコールジメタクリレート0.03gおよび水200gを秤量したこと以外は、実施例 1 と同様に磁性体内包粒子を作製した。

【0036】

(比較例 2)

200mlの四つ口フラスコにスチレン6.0g、ポリエチレングリコールメタクリレート0.3g、エチレングリコールジメタクリレート0.03gおよび水200gを秤量したこと以外は、実施例 1 と同様に磁性体内包粒子を作製した。

【0037】

得られた磁性体内包粒子分散液は、目視で粒子の分散状態を観察した。また、精製した磁性体内包粒子を水で希釈し、金属メッシュで支持したコロジオン膜上に沈着固定して、透過型電子顕微鏡 (TEM) により、粒子の形態を観察した。

【0038】

実施例 1、2、3 では、いずれも分散安定性の高い粒子が得られた。一方、比較例 1 では、凝集塊が認められ、時間が経つにつれて粒子が沈降する分散安定性の低いものであった。また、比較例 2 は重合中に凝集が生じた。

【0039】

TEMで観察された磁性体内包粒子の平均粒径と磁性体の大きさを表 1 に示す。なお、比較例 2 は凝集塊を除去後、超音波処理により分散した粒子を用いた。

【0040】

【表 1】

	平均粒径 (μm)	磁性体 (nm)
実施例 1	230	5
実施例 2	190	6
実施例 3	320	4
比較例 1	210	6
比較例 2	260	—

【0041】

表 1 より、実施例 1、2、3 は、いずれも均一粒径の球形粒子で、磁性体を内

包していることが観察された。一方、比較例 1 は、形状が異形であった。また、比較例 2 では、磁性体が粒子内部にほとんど存在せずに、粒子表面に付着している様子が観察された。

【0042】

作製した磁性体内包粒子（実施例 1、2、3）は、磁石へ引き寄せられることの確認として 1.5ml のマイクロチューブに試料を少量取り、蒸留水で適当に希釈して磁石つきマイクロチューブ立て（DYNAL 社製、MPCR[®]HM）にチューブを立てて、分散している粒子が磁石に引き寄せられることを視覚により確認した。

【0043】

【発明の効果】

本発明は上述の構成よりなるので、疎水モノマーと親水性モノマーとを共重合して粒子を形成する反応と、粒子内に金属イオンを取り込ませながら金属イオンを変性して磁性体を形成する反応を同時に行うことによって、均一な磁性を有し、かつ、粒子径分布の狭い磁性体内包粒子を得ることができる。本発明の磁性体内包粒子に抗原または抗体を吸着または結合させることにより本発明の免疫測定用粒子を得ることができる。更に、この磁性体を含む免疫測定用粒子を標識とする免疫測定法において感度よく精密な測定が可能になる。

【書類名】 要約書**【要約】****【課題】**

本発明は、均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子およびそれを用いる免疫測定法を提供することを目的とする。

【解決手段】

スチレン系モノマーとグリシジル基含有モノマーを主構成成分とするモノマー混合物を重合してなる有機高分子物質と磁性体からなる磁性体内包粒子であって、該粒子がその内部に平均粒径 $1 \sim 30 \text{ nm}$ の磁性体を分散状態で含有する磁性体内包粒子。スチレン系モノマーの比率が $5 \sim 90 \text{ wt} \%$ であること、有機高分子物質が架橋されていること、平均粒子径が $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$ であることが好ましい。表面層にカルボキシル基等で抗原または抗体が吸着または結合された免疫測定用粒子とし、この免疫測定用粒子を用いる免疫測定法が提供される。

【選択図】 なし

特願 2003-111994

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002174]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
氏 名	積水化学工業株式会社